

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

07 March 1997 (07.03.97)

International application No.

PCT/EP95/02915

International filing date (day/month/year)

24 July 1995 (24.07.95)

Applicant

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH et al

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

_____ copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

A. Karkachi

Telephone No.: (41-22) 730.91.11

PATENT COOPERATION TREATY

EO/US
PCT/EP95/02915

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Washington D.C. 20231
United States of America

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

08 February 1996 (08.02.96)

International application No.:

PCT/EP95/02915

Applicant's or agent's file reference:

11051P WO/WWbj

International filing date:

24 July 1995 (24.07.95)

Priority date:

25 July 1994 (25.07.94)

Applicant:

JOSEL, Hans-Peter et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

27 December 1995 (27.12.95)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 730.91.11

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

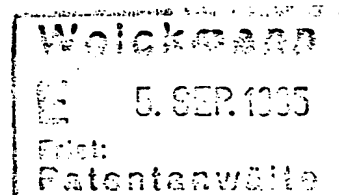
NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WEICKMANN, H.
Kopernikusstrasse 9
D-81679 München
ALLEMAGNE



Date of mailing (day/month/year) 30 August 1995 (30.08.95)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 11051P WO/WWbj	International application No. PCT/EP95/02915

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (for all designated States except US)
JOSEL, Hans-Peter et al (for US)

International filing date : 24 July 1995 (24.07.95)
Priority date(s) claimed : 25 July 1994 (25.07.94)
31 August 1994 (31.08.94)
31 August 1994 (31.08.94)
04 November 1994 (04.11.94)

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 30 August 1995 (30.08.95)

Designated Offices which will be notified of the receipt of the record copy :

EP : AT,BE,CH,DE,DK,ES,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
National : AU,CA,CN,FI,JP,KR,NO,NZ,US

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase;
☒ confirmation of precautionary designations;
☐ requirements regarding priority documents.

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: B. Schmitt Telephone No. (41-22) 730.91.11
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

PCT/EP 95 / 0 2 9 15

Internationales Aktenzeichen

24 JUL 1995

(24. 07. 95)

Internationales Anmeldedatum

EUROPEAN PATENT OFFICE

PCT INTERNATIONAL APPLICATION

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) **11051P WO/WWbj**

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG Oligomere Trägermoleküle mit definiert eingebauten Markierungsgruppen und Haptenen

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Boehringer Mannheim GmbH
Sandhofer Straße 112 - 132
D-68305 Mannheim
DE

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☐ alle Bestimmungsstaaten ☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

JOSEL, Hans-Peter
Prälatenweg 7
D-82362 Weilheim
DE

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:

☒ Anwalt

☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Weickmann H., Fincke K., Weickmann F.A.,
Huber B., Liska H., Prechtel J., Böhm B.,
Weiß W.
Kopernikusstraße 9, D-81679 München
DE

Telefonnr.:
089/45563-0

Telefaxnr.:
089/4705068

Fernschreibnr.:
522621 wepat d

☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Blatt Nr. 2

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER	
<i>Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.</i>	
Name und Anschrift: <small>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)</small> FINKE, Andreas Hochfeldstraße 72 D-82377 Penzberg DE	Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <small>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</small>
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
Name und Anschrift: <small>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)</small> HERRMANN, Rupert In der Au 23 D-82362 Weilheim DE	Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <small>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</small>
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
Name und Anschrift: <small>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)</small> HÖSS, Eva Am Mühlberg 1A D-82319 Starnberg DE	Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <small>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</small>
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
Name und Anschrift: <small>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)</small> MARSCHALL, Andreas Schollstraße 3 D-69469 Weinheim DE	Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <small>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</small>
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.	

Blatt Nr.3..

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER			
<i>Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.</i>			
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)</i> <div style="text-align: center;">SEIDEL, Christoph Ammerstraße 39 D-82362 Weilheim DE</div>		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <i>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</i>	
Staatsangehörigkeit (Staat): DE		Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten			
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)</i> 		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <i>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</i>	
Staatsangehörigkeit (Staat):		Sitz oder Wohnsitz (Staat):	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten			
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)</i> 		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <i>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</i>	
Staatsangehörigkeit (Staat):		Sitz oder Wohnsitz (Staat):	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten			
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)</i> 		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <i>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</i>	
Staatsangehörigkeit (Staat):		Sitz oder Wohnsitz (Staat):	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten			
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)</i> 		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <i>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</i>	
Staatsangehörigkeit (Staat):		Sitz oder Wohnsitz (Staat):	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten			
<input type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.			

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgennommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☐ AP ARIPO-Patent: KE Kenia, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

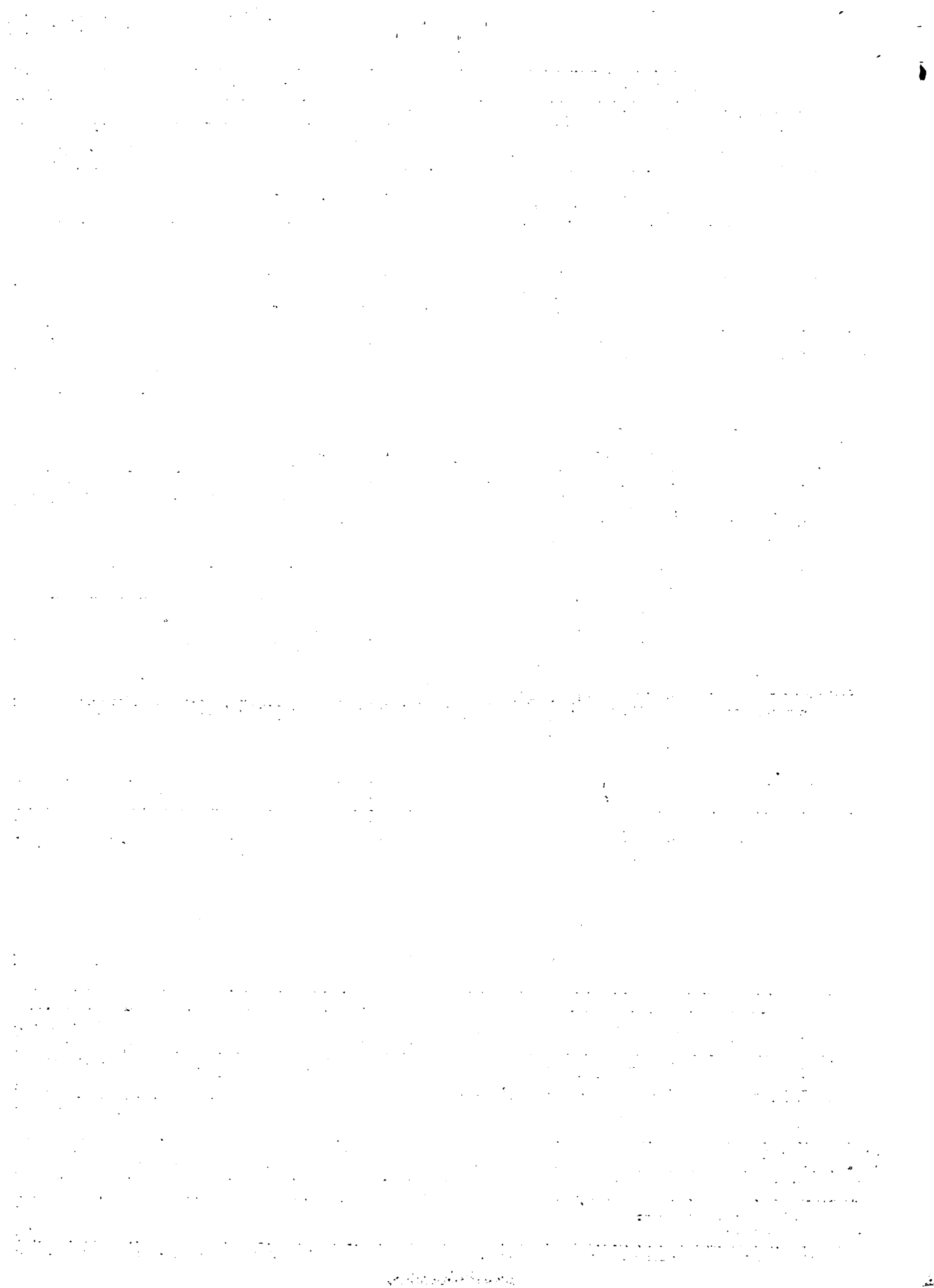
- | | |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> PL Polen |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland | <input type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input type="checkbox"/> IS Island | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| | <input type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LT Litauen | |
| <input type="checkbox"/> LU Luxemburg | |
| <input type="checkbox"/> LV Lettland | |

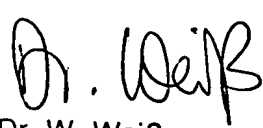
Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

- ☐
- ☐
- ☐
- ☐

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehten.)



Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH		Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. <input checked="" type="checkbox"/>	
Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:			
Staat (Anmelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1) DE	25.7.1994 25 JUL 1994	P 44 26 276.0	
(2) DE	31 AUG 1994 (31.8.1994)	P 44 30 998.8	
(3) DE	31 AUG 1994 (31.8.1994)	P 44 30 973.2	
Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden): <input type="checkbox"/> Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.			
Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE			
Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA) (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt): ISA / _____ EPA			
Frühere Recherche: Ausfüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen. Staat (oder regionales Amt): _____ Datum (Tag/Monat/Jahr): _____ Aktenzeichen: _____			
Feld Nr. VIII KONTROLLISTE			
Diese internationale Anmeldung umfaßt: 1. Antrag : 6 Blätter 2. Beschreibung : 24 Blätter 3. Ansprüche : 8 Blätter 4. Zusammenfassung : 1 Blätter 5. Zeichnungen : 2 Blätter Insgesamt : 41 Blätter		Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei: 1. <input type="checkbox"/> Unterzeichnete gesonderte Vollmacht 2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht 3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift 4. <input checked="" type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen): (1-4) 5. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung 6. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen 7. <input type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette) 8. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten):	
Abbildung Nr. _____ der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.			
Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS			
Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.			
 Dr. W. Weiß			
(24. Juli 1995)			

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung: 24 JUL 1995	2. Zeichnungen <input checked="" type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde: ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

Zusatzfeld Wird dieses Zusatzfeld nicht benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Dieses Feld ist in folgenden Fällen auszufüllen:

1. Wenn der Platz in einem Feld nicht für alle Angaben ausreicht:

insbesondere:

- i) Wenn mehr als zwei Anmelder und/oder Erfinder vorhanden sind und kein Fortsetzungsblatt zur Verfügung steht:
- ii) Wenn in Feld Nr. II oder III die Angabe "die im Zusatzfeld angegebenen Staaten" angekreuzt ist:
- iii) Wenn der in Feld Nr. II oder III genannte Erfinder oder Erfinder/Anmelder nicht für alle Bestimmungsstaaten oder für die Vereinigten Staaten von Amerika als Erfinder benannt ist:
- iv) Wenn zusätzlich zu dem Anwalt/den Anwälten, die in Feld Nr. IV angegeben sind, weitere Anwälte bestellt sind:
- v) Wenn in Feld Nr. V bei einem Staat (oder bei OAPI) die Angabe "Zusatzpatent" oder "Zusatzzertifikat" oder wenn in Feld Nr. V bei den Vereinigten Staaten von Amerika die Angabe "Fortsetzung" oder "Teilfortsetzung" hinzugefügt wird:
- vi) Wenn die Priorität von mehr als drei früheren Anmeldungen beansprucht wird:

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. ..." [Nummer des Feldes angeben] die gleichen Angaben zu machen wie in dem Feld vorgesehen, das platzmäßig nicht ausreicht;

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. III" für jede weitere Person die in Feld Nr. III vorgesehenen Angaben zu machen.

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. II", "Fortsetzung von Feld Nr. III" oder "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" die Namen der Anmelder und neben jedem Namen der Staat oder die Staaten (und/oder ggf. ARIPO-, europäisches oder OAPI-Patent) anzugeben, für die die bezeichnete Person Anmelder ist.

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. II" oder "Fortsetzung von Feld Nr. III" oder "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" der Name des Erfinders und neben jedem Namen der Staat oder die Staaten (und/oder ggf. ARIPO-, europäisches oder OAPI-Patent) anzugeben, für die die bezeichnete Person Erfinder ist.

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. IV" für jeden weiteren Anwalt die gleichen Angaben zu machen wie in Feld Nr. IV vorgesehen.

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. V" die Namen der betreffenden Staaten (oder OAPI) und nach dem Namen jeder dieser Staaten (oder OAPI) das Aktenzeichen des Hauptschutzrechts oder der Hauptschutzrechtsanmeldung und das Datum der Erteilung des Hauptschutzrechts oder der Einreichung der Hauptschutzrechtsanmeldung anzugeben.

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. VI" für jede weitere frühere Anmeldung die gleichen Angaben zu machen wie in Feld Nr. VI vorgesehen.

2. Wenn der Anmelder für irgendein Bestimmungsamt die Vergünstigung nationaler Vorschriften betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit in Anspruch nimmt:

In diesem Fall ist mit dem Vermerk "Erklärung betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit" nachstehend diese Erklärung abzugeben.

Fortsetzung von Feld Nr. VI Prioritätsanspruch:

4) DE (4.11.1994) P 44 39 345.8
04 NOV 1994

TRANSLATION
PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

7

Applicant's or agent's file reference 11051P WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP 95/02915	International filing date (day/month/year) 24.07.95	Priority date (day/month/year) 25.07.94
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N33/532		
Applicant BOEHRINGER MANNHEIM GMBH et al.		

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>8</u> sheets.
3.	This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of the invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 27.12.95	Date of completion of this report 27.09.96
Name and mailing address of the IPEA/ EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP95/02915

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-24 . as originally filed.
 pages _____ . filed with the demand.
 pages _____ . filed with the letter of _____
 pages _____ . filed with the letter of _____

☒ the claims. Nos. _____ . as originally filed.
 Nos. _____ . as amended under Article 19.
 Nos. _____ . filed with the demand.
 Nos. 1-38 . filed with the letter of 22.07.96
 Nos. _____ . filed with the letter of _____

☒ the drawings, sheets/fig 1/2, 2/2 . as originally filed.
 sheets/fig _____ . filed with the demand.
 sheets/fig _____ . filed with the letter of _____
 sheets/fig _____ . filed with the letter of _____

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims. Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 95/02915

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1 - 38	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1 - 38	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 38	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The subject matters of claims 1 - 38 do not appear to be either known from, or suggested by, the cited prior art. The subject matters of these claims therefore meet the criteria of PCT Article 33(2) and (3).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 95/02915

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. The description has not cited the documents R. Bredehorst et al. (1991), Analytical Chemistry 193, 272 - 279, or EP-A-0 135 071 or briefly outlined the relevant state of the art contained therein. The requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii) are therefore not satisfied.
2. The amended claims are assumed to meet the criteria of PCT Article 33(1). However, the applicant has not brought the description into conformity with the claims. The requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii) and (iii) are therefore not satisfied.

11

(1)

**VERTRETUNG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

PCT/EP 95/02915

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 11051P WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 95/ 02915	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 24/07/1995	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 25/07/1994
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK <p style="text-align: center;">G01N33/532</p>		
Anmelder BOEHRINGER MANNHEIM GMBH et al.		

1. Der internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.


2. Dieser **BERICHT** umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht **ANLAGEN** bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT)

Diese Anlagen umfassen insgesamt 8 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben und die entsprechenden Seiten zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 27/12/1995	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 27. 09. 96
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter W. Linker W. Linker Tel.

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.)

☐ der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung.

☒ der Beschreibung, Seite/n 1-24 _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

Seite/n _____, eingereicht mit dem Antrag.

Seite/n _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.

Seite/n _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.

☒ der Ansprüche, Nr. _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

Nr. _____, in der nach Artikel 19 geänderten Fassung.

Nr. _____, eingereicht mit dem Antrag.

Nr. 1-38 _____, eingereicht mit Schreiben vom 22.07.96.

Nr. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.

☒ der Zeichnungen, Blatt/Abb. 1/2, 2/2 _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

Blatt/Abb. _____, eingereicht mit dem Antrag.

Blatt/Abb. _____, eingereicht mit Schreiben
vom _____.

Blatt/Abb. _____, eingereicht mit Schreiben
vom _____.

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

☐ Beschreibung: Seite _____.

☐ Ansprüche: Nr. _____.

☐ Zeichnungen: Blatt/Abb. _____.

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2 c)).

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
-



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erläuterungen zur Stützung dieser Feststellung

1. FESTSTELLUNG

Neuheit	Ansprüche 1-38 _____	JA
	Ansprüche _____	NEIN
Erfinderische Tätigkeit	Ansprüche 1-38 _____	JA
	Ansprüche _____	NEIN
Gewerbliche Anwendbarkeit	Ansprüche 1-38 _____	JA
	Ansprüche _____	NEIN

2. UNTERLAGEN UND ERLÄUTERUNGEN

Die Gegenstände der Ansprüche 1-38 scheinen aus dem ermittelten Stand der Technik weder bekannt noch nahegelegt zu sein. Die Gegenstände dieser Ansprüche erfüllen daher die in Artikel 33(2) und (3) PCT genannten Kriterien.

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

1. Die Dokumente R. BREDEHORST et al. (1991), Analytical Chemistry 193, 272-279 sowie EP-A-0 135 071 wurden in der Beschreibung nicht angegeben; auch der darin enthaltene einschlägige Stand der Technik wurde nicht kurz umrissen. Die Erfordernisse der Regel 5.1(a)(ii) PCT sind somit nicht erfüllt.
2. Es wird davon ausgegangen, daß die eingereichten neuen Ansprüche die in Artikel 33(1) PCT genannten Kriterien erfüllen. Allerdings hat der Anmelder die Beschreibung nicht an die Ansprüche angepaßt. Die Erfordernisse der Regel 5.1(a)(ii), (iii) PCT sind somit nicht erfüllt.

WWmy/11051P WO

PATENTANSPRÜCHE

1. Konjugat, umfassend einen polymeren Träger mit maximal 100 monomeren Einheiten, der gekoppelt an reaktive Seitengruppen 1 - 10 Haptenmoleküle und 1 - 10 Markierungs- oder Festphasenbindungsgruppen enthält, wobei die monomeren Einheiten aus Nukleotiden, Nukleotidanaloga und peptidischen Nukleinsäuren ausgewählt sind.
2. Konjugat, umfassend einen polymeren Träger mit maximal 100 monomeren Einheiten, der gekoppelt an reaktive Seitengruppen 1 - 10 Haptenmoleküle und 1 - 10 Markierungs- oder Festphasenbindungsgruppen enthält, wobei die monomeren Einheiten aus Aminosäuren und die Markierungsgruppen aus lumineszierenden Metallchelaten ausgewählt sind.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß der polymere Träger eine Länge von 3 - 80 monomeren Einheiten aufweist.
4. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der polymere Träger eine Länge von 5 - 60 monomeren Einheiten aufweist.
5. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß es 1 - 6 Haptenmoleküle enthält.
6. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß es 2 - 8 Markierungs- oder Festphasenbindungsgruppen enthält.

GEÄNDERTES BLATT

7. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 oder 3-6,
dadurch gekennzeichnet,
daß der polymere Träger eine aus Nukleotiden oder/und
Nukleotidanaloga aufgebaute Kette umfaßt.
8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 oder 3-6,
dadurch gekennzeichnet,
daß der polymere Träger eine aus peptidischen Nukleinsäuren
aufgebaute Kette umfaßt.
9. Konjugat nach Anspruch 7 oder 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß der polymere Träger als Doppelstrang vorliegt.
10. Konjugat nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Doppelstrang mindestens eine Kette enthält, die
peptidische Nukleinsäuren umfaßt.
11. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Haptenmoleküle und Markierungs- bzw. Festphasenbin-
dungsgruppen über reaktive Amino- oder/und Thiol-Seiten-
gruppen an den polymeren Träger gekoppelt sind.
12. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 oder 3-11,
dadurch gekennzeichnet,
daß es Markierungsgruppen enthält, die aus lumineszierenden
Metallchelaten oder Fluoreszenzgruppen ausgewählt sind.
13. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß es Festphasenbindungsgruppen enthält, die aus Biotin
und Biotinanaloga ausgewählt sind.

14. Konjugat nach Anspruch 2 oder 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierungsgruppen lumineszierende Metallchelate
sind und der polymere Träger mindestens einen positiven
oder/und negativen Ladungsträger enthält.
15. Konjugat nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierungsgruppen Fluoreszenzgruppen sind und
polymere Träger eine im wesentlichen helikale Struktur
aufweist.
16. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Hapten ein immunologisch reaktives Molekül mit
einer Molekularmasse von 100-2000 Da ist.
17. Konjugat nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Hapten aus pharmakologischen Wirkstoffen, Hormonen,
Metaboliten, Vitaminen, Mediatoren und Neurotransmittern
ausgewählt ist.
18. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Hapten aus immunologisch reaktiven Peptidepitopen
mit einer Länge bis zu 30 Aminosäuren ausgewählt ist.
19. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Hapten aus Nukleinsäuren mit einer Länge bis zu 50
Nukleotiden ausgewählt ist.
20. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Hapten aus peptidischen Nukleinsäuren mit einer
Länge bis zu 50 Monomereinheiten ausgewählt ist.

21. Verfahren zur Herstellung von Konjugaten, umfassend einen polymeren Träger mit maximal 100 monomeren Einheiten, der gekoppelt an reaktive Seitengruppen 1 - 10 Haptenmoleküle und 1 - 10 Markierungs- oder Festphasenbindungsgruppen enthält, wobei die monomeren Einheiten aus Nukleotiden, Nukleotidanaloga und peptidischen Nukleinsäuren ausgewählt sind,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen polymeren Träger aus monomeren Einheiten an einer Festphase synthetisiert, wobei man
- (a) während der Synthese an vorbestimmten Positionen des Trägers Monomerderivate einführt, die kovalent mit Haptenmolekülen oder/und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen gekoppelt sind, oder/und
 - (b) nach der Synthese aktivierte Haptenmoleküle oder/und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen an reaktive Seitengruppen des Trägers koppelt.
22. Verfahren nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen Peptidträger aus Aminosäurederivaten synthetisiert.
23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Variante (a) die Haptenmoleküle oder/und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen jeweils an eine primäre Aminogruppe oder eine Thiolgruppe des Monomerderivats gekoppelt sind.
24. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Variante (b) die Kopplung an Amino- oder/und Thiol-Seitengruppen des Trägers nach Abspaltung von Schutzgruppen der zur Festphasensynthese verwendeten Monomerderivate erfolgt.

25. Verfahren nach Anspruch 21, 22 oder 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß man nach der Synthese in Variante (b) die Hapten-
moleküle und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen an
primäre Aminoseitengruppen des Trägers koppelt, wobei an
Positionen des Trägers, an denen eine Kopplung mit Hapten-
molekülen erfolgen soll, ein Monomerderivat mit einer
ersten Schutzgruppe für die Amino-Seitengruppe verwendet
wird, und an Positionen des Trägers, an denen eine Kopplung
mit Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen erfolgen
soll, ein Monomerderivat mit einer zweiten Schutzgruppe für
die Aminoseitengruppe verwendet wird und die erste und die
zweite Schutzgruppe so ausgewählt werden, daß eine selek-
tive Schutzgruppenabspaltung möglich ist.
26. Verfahren nach Anspruch 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß die erste und zweite Schutzgruppe aus säurelabilen bzw.
säurestabilen Schutzgruppen ausgewählt werden.
27. Verwendung von Konjugaten nach einem der Ansprüche 1 bis 20
oder hergestellt durch ein Verfahren nach einem der
Ansprüche 21-26 als Antigen in einem immunologischen
Verfahren oder zur Nukleinsäure-Diagnostik.
28. Verwendung nach Anspruch 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Konjugate, die mehr als 1 Haptenmolekül enthalten,
als Polyhaptene in immunologischen Nachweisverfahren
einsetzt.
29. Verwendung nach Anspruch 27 oder 28 in einem kompetitiven
Immunoassay.
30. Verwendung nach Anspruch 27 oder 28 in einem Immunoassay
zum Nachweis spezifischer Antikörper.



31. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probenflüssigkeit nach dem Prinzip des kompetitiven Immunoassay im "labelled analog" Format,
dadurch gekennzeichnet,
daß man
- (a) die Probenflüssigkeit in Gegenwart einer reaktiven Festphase mit einem Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 20 oder hergestellt durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 21-26, das eine Markierungsgruppe enthält, und einem Rezeptor, der an die Festphase gebunden oder zur Bindung an eine Festphase fähig ist und eine spezifisch immunologische Reaktion mit dem Analyten und der Haptenkomponente des Konjugats eingehen kann, inkubiert,
 - (b) die Festphase gegebenenfalls von der Inkubationsflüssigkeit abtrennt und
 - (c) das Vorhandensein oder/und die Menge des Analyten in der Probenflüssigkeit durch Messung der Markierungs-komponente des Konjugats in der Festphase oder/und in der Inkubationsflüssigkeit bestimmt.
32. Verfahren nach Anspruch 31,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Rezeptor einen biotinylierten Antikörper bzw. ein biotinyliertes Antikörperfragment und eine mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase verwendet.
33. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probenflüssigkeit nach dem Prinzip des kompetitiven Immunoassay im "labelled antibody" Format,
dadurch gekennzeichnet,
daß man
- (a) die Probenflüssigkeit in Gegenwart einer reaktiven Festphase mit einem Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 20 oder hergestellt durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 21-26, das eine Festphasenbindungsgruppe enthält, und einem Rezeptor, der eine



Markierungsgruppe trägt und eine spezifisch immunologische Reaktion mit dem Analyten und der Haptenkomponente des Konjugats eingehen kann, inkubiert,

- (b) die Festphase gegebenenfalls von der Inkubationsflüssigkeit abtrennt und
- (c) das Vorhandensein oder/und die Menge des Analyten in der Probeflüssigkeit durch Messung der Markierungs-komponente des Rezeptors in der Festphase oder/und in der Inkubationsflüssigkeit bestimmt.

34. Verfahren nach Anspruch 33,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein biotinyliertes Konjugat und eine mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase verwendet.

35. Verfahren zum Nachweis eines spezifischen Antikörpers in einer Probeflüssigkeit,
dadurch gekennzeichnet,
daß man

- (a) die Probeflüssigkeit mit mindestens einem Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 20 oder hergestellt durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 21-26, das gegen den zu bestimmenden Antikörper gerichtet ist, inkubiert und
- (b) den Antikörper über eine Bindung mit dem Konjugat nachweist.

36. Verfahren nach Anspruch 35,
dadurch gekennzeichnet,
daß man

- (a) die Probeflüssigkeit in Gegenwart einer reaktiven Festphase und zwei gegen den zu bestimmenden Antikörper gerichteten Antigenen inkubiert, wobei das erste Antigen eine Markierungsgruppe trägt und das zweite Antigen an die Festphase gebunden oder in einer an die Festphase bindefähigen Form vorliegt,

- (b) die Festphase gegebenenfalls von der Inkubationsflüssigkeit abtrennt und
 - (c) das Vorhandensein oder/und die Menge des Antikörpers durch Bestimmung der Markierung in der Festphase oder/und in der flüssigen Phase nachweist,
- wobei man als erstes oder/und zweites Antigen ein Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 20 oder hergestellt durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 21-26 verwendet.

37. Verfahren nach Anspruch 36,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als erstes Antigen ein mit einem lumineszierenden Metallchelat oder einer Fluoreszenzgruppe markiertes Konjugat verwendet.
38. Verfahren nach Anspruch 36 oder 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als zweites Antigen ein biotinyliertes Konjugat und eine mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase verwendet.



PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)(51) Internationale Patentklassifikation⁶ :G01N 33/532, 33/533, 33/58, C12Q 1/68,
G01N 33/543

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/03650

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

8. Februar 1996 (08.02.96)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP95/02915

(22) Internationales Anmeldedatum:

24. Juli 1995 (24.07.95)

(30) Prioritätsdaten:

P 44 26 276.0	25. Juli 1994 (25.07.94)	DE
P 44 30 998.8	31. August 1994 (31.08.94)	DE
P 44 30 973.2	31. August 1994 (31.08.94)	DE
P 44 39 345.8	4. November 1994 (04.11.94)	DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):
BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer
Strasse 112-132, D-68305 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JOSEL, Hans-Peter
[DE/DE]; Prälatenweg 7, D-82362 Weilheim (DE). FINKE,
Andreas [DE/DE]; Hochfeldstrasse 72, D-82377 Penzberg
(DE). HERRMANN, Rupert [DE/DE]; In der Au 23,
D-82362 Weilheim (DE). HÖSS, Eva [DE/DE]; Am
Mühlberg 1A, D-82319 Starnberg (DE). MARSCHALL,
Andreas [DE/DE]; Schollstrasse 3, D-69469 Weinheim
(DE). SEIDEL, Christoph [DE/DE]; Ammerstrasse 39,
D-82362 Weilheim (DE).(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-
81679 München (DE).(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, FI, JP, KR, NO, NZ, US,
europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB,
GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: OLIGOMER CARRIER MOLECULES IN WHICH MARKER GROUPS AND HAPTENS ARE SELECTIVELY INCORPORATED

(54) Bezeichnung: OLIGOMERE TRÄGERMOLEKÜLE MIT DEFINIERT EINGEBAUTEN MARKIERUNGSGRUPPEN UND HAPTENEN

(57) Abstract

The present invention concerns novel conjugates, process for manufacturing them, and the use of such conjugates as antigens in immunological detection processes or in DNA diagnostic procedures.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Konjugate, Verfahren zu deren Herstellung sowie die Verwendung dieser Konjugate als Antigene in immunologischen Nachweisverfahren oder zur DNA-Diagnostik.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Oligomere Trägermoleküle mit definiert eingebauten Markierungsgruppen und Haptenen

BESCHREIBUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Konjugate, Verfahren zu deren Herstellung sowie die Verwendung dieser Konjugate als Antigene in immunologischen Nachweisverfahren oder zur DNA-Diagnostik.

Der Nachweis von Immunglobulinen in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Humanseren, wird zur Diagnostik von Infektionen mit Mikroorganismen, insbesondere Viren, wie etwa HIV, Hepatitis-Viren, etc. verwendet. Das Vorhandensein von spezifischen Immunglobulinen in der untersuchten Probe wird üblicherweise durch Reaktion mit einem oder mehreren Antigenen, die mit den spezifischen Immunglobulinen reagieren, nachgewiesen. Verfahren zur Bestimmung von spezifischen Immunglobulinen in der Probenflüssigkeit müssen sensitiv, zuverlässig, einfach und schnell sein.

Ein weiteres immunologisches Verfahren ist der kompetitive Immunoassay, bei dem der qualitative und quantitative Nachweis eines Analyten dadurch erfolgt, daß ein mit dem Analyten immunologisch analoges Hapten und der Analyt um Bindungsstellen auf einem Rezeptor, z.B. einem Antikörper konkurrieren. Das Analytenanalogon wird dabei im allgemeinen in markierter oder an eine Festphase bindefähiger Form eingesetzt.

In den letzten Jahren wurden zunehmend Nachweissysteme auf Basis nicht-radioaktiver Markierungsgruppen entwickelt, bei denen das Vorhandensein eines Analyten, z.B. eines spezifischen Antikörpers, in der untersuchten Probe mit Hilfe optischer (z.B. Lumineszenz oder Fluoreszenz), NMR-aktiver oder Metall-präzipitierender Detektionssysteme bestimmt werden konnte.

EP-A-0 307 149 offenbart einen Immuntest für einen Antikörper, bei dem zwei rekombinante Polypeptide als Antigene verwendet werden, von denen eines an einer festen Phase immobilisiert ist, und das andere eine Markierungsgruppe trägt, wobei beide rekombinanten Antigene in unterschiedlichen Organismen exprimiert werden, um die Spezifität des Nachweises zu erhöhen.

EP-A-0 366 673 offenbart ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern in einer Probe, bei dem ein Antikörper durch Reaktion mit einem gereinigten, markierten Antigen und dem gleichen gereinigten Antigen in einer Festphasen-gebundenen Form nachgewiesen wird. Als Antigen wird beispielsweise humanes IgG offenbart.

EP-A-0 386 713 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV unter Verwendung von zwei festen Trägern, wobei an beide festen Träger verschiedene HIV-Antigene immobilisiert werden, die jeweils mit einem Aliquot einer Probe und einem markierten HIV-Antigen in Kontakt gebracht werden, wobei das Vorhandensein von Antikörpern durch eine positive Reaktion in mindestens einem der Tests nachgewiesen wird. Als HIV-Antigene werden rekombinant hergestellte Polypeptide offenbart.

EP-A-0 507 586 beschreibt ein Verfahren zur Durchführung eines immunologischen Tests für ein spezifisches Immunglobulin, bei dem eine Probe mit zwei zur Bindung des Immunglobulins fähigen Antigenen in Kontakt gebracht wird, wobei das erste Antigen eine zur Bindung an einen festen Träger geeignete Gruppe trägt, und das zweite Antigen eine Markierungsgruppe trägt. Die Markierungsgruppe kann eine direkte Markierungsgruppe sein, z.B. ein Enzym, ein Chromogen, ein Metallteilchen, oder auch eine indirekte Markierungsgruppe, d.h. die am Antigen angebrachte Markierungsgruppe kann mit einem Rezeptor für die Markierungsgruppe, der wiederum eine signalerzeugende Gruppe trägt, reagieren. Als Beispiel für eine solche indirekte Markierungsgruppe wird ein Fluoresceinderivat genannt, dessen Rezeptor ein Antikörper ist, der wiederum mit einem Enzym gekoppelt ist. Als Antigene werden Polypeptide, wie etwa das Hepatitis B-Oberflächenantigen offenbart. In dieses

Antigen werden durch Derivatisierung SH-Gruppen eingeführt, mit denen das Fluorescein gekoppelt wird.

EP-A-0 507 587 offenbart ein spezifisch zum Nachweis von IgM Antikörpern geeignetes Verfahren, bei dem die Probe mit einem markierten Antigen, das gegen den nachzuweisenden Antikörper gerichtet ist, und einem zweiten Antikörper, der ebenfalls gegen den nachzuweisenden Antikörper gerichtet und an eine Festphase bindefähig ist, inkubiert wird.

EP-A-0 199 804 und EP-A-0 580 979 offenbaren ein immunologisches Nachweisverfahren unter Verwendung von Antigenen, die mit lumineszierenden Metallchelatgruppen, insbesondere mit Ruthenium- und Osmiumchelatgruppen markiert sind. Als Antigene werden Immunglobuline verwendet, die durch Reaktion mit aktivierten Metallkomplexen statistisch markiert werden.

EP-A-0 178 450 offenbart Metallchelate, insbesondere Rutheniumkomplexe, an die ein immunologisch aktives Material, beispielsweise Antikörper, gekoppelt werden kann. Die Kopplung erfolgt durch statistische Reaktion des immunologisch reaktiven Materials mit dem Metallchelate.

EP-A-0 255 534 offenbart einen Lumineszenz-Immunoassay unter Verwendung eines Metallchelate-gekoppelten Antigens oder Antikörpers. Die Kopplung erfolgt beispielsweise durch statistische Reaktion eines Metallchelate-Aktivsterderivats mit einem Antikörper.

WO 90/05301 offenbart ein Verfahren zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Analyten durch Elektrochemilumineszenz unter Verwendung von lumineszierenden Metallchelaten, die an (i) einen zugesetzten Analyten, (ii) einen Bindepartner des Analyten oder (iii) eine reaktive Komponente, die mit (i) oder (ii) binden kann, gekoppelt sind. Die Lumineszenzmessung erfolgt nach Bindung der Metallchelate an aktivierte und gegebenenfalls magnetische Mikropartikel.

Bei den aus dem Stand der Technik bekannten immunologischen Nachweisverfahren für Antikörper werden üblicherweise Polypeptid-Antigene verwendet, die meist durch rekombinante DNA-Methoden erzeugt wurden. Beim Einsatz derartiger Polypeptid-Antigene können jedoch Probleme auftreten. So können rekombinante Polypeptide oft nur in Form von Fusionspolypeptiden erzeugt werden, bei denen der Fusionsanteil zu falsch positiven Resultaten im Test führen kann. Weiterhin zeigen durch rekombinante Expression erzeugte Polypeptide oft eine nur geringe Stabilität in der Probelösung und neigen zu Aggregation. Ein weiterer Nachteil ist, daß oft keine selektive und reproduzierbare Einführung von Markierungsgruppen in solche Polypeptide möglich ist.

Überdies ist die Herstellung rekombinanter Polypeptidantigene mit hohen Kosten verbunden und es können größere Schwankungen in der immunologischen Reaktivität bei verschiedenen Chargen rekombinanter Polypeptide auftreten.

Auch bei kompetitiven Immunoassays, die sehr hohe Anforderungen an die Sensitivität und Präzision stellen, können beim Nachweis von nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegenden Analyten wie etwa Estradiol oder Testosteron, insbesondere bei Nachweis-systemen auf Basis von Elektrochemilumineszenz die geforderten unteren Nachweisgrenzen unter Verwendung bekannter Antigene nur sehr schwer erreicht werden.

Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Problem war somit die Bereitstellung eines Verfahrens, bei dem auf einfache und effiziente Weise Antigene für immunologische Tests erzeugt werden können, wobei die Nachteile der aus dem Stand der Technik bekannten Antigene mindestens teilweise beseitigt werden. Weiterhin soll das Verfahren eine selektive und reproduzierbare Einführung von Markierungsgruppen in die Antigene ermöglichen.

Dieses Problem wird gelöst durch Konjugate, umfassend einen polymeren Träger mit maximal 100 monomeren Einheiten, der

gekoppelt an reaktive Seitengruppen 1-10 Haptenmoleküle und 1-10 Markierungs- oder Festphasenbindungsgruppen enthält, wobei die monomeren Einheiten aus Aminosäuren, Nukleotiden und peptidischen Nukleinsäuren ausgewählt sind.

Durch Verwendung der erfindungsgemäßen Konjugate, die 1-10 Haptenmoleküle und eine definierte Anzahl von Markierungs- oder Festphasenbindungsgruppen enthalten, als Antigene in einem immunologischen Nachweisverfahren kann überraschenderweise eine wesentlich höhere Sensitivität und Präzision bei einer gleichzeitig verringerten unteren Nachweisgrenze gegenüber bekannten monomeren und multimeren Antigenen erreicht werden. Darüber hinaus lassen sich die erfindungsgemäßen Konjugate in sehr einfacher Weise durch Festphasensynthese, z.B. eine Peptid-Festphasensynthese, aufbauen. Hierzu können an jeweils vorbestimmten Positionen monomere Einheiten, z.B. Aminosäurederivate, eingebaut werden, die mit einem Haptenmolekül oder einer Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppe derivatisiert sind. Überdies kann an Positionen der Trägerkette, an denen sich Monomere mit freien funktionellen Gruppen befinden, nach Abschluß der Festphasensynthese ein zusätzlicher selektiver Einbau von Haptenen oder Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen erfolgen. Dadurch ist ein definierter und reproduzierbarer Einbau von Haptenmolekülen und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen in das Konjugat möglich. Die Abstände zwischen den einzelnen Gruppen auf dem Konjugat können genau festgelegt und gegebenenfalls variiert werden. Durch Auswahl des Abstandes von Markierungsgruppen auf dem Konjugat kann das Signalquenching gering gehalten werden, so daß die Signalstärke proportional mit der Zahl von Markierungsgruppen zunimmt. Auch eine festgelegte räumliche Orientierung von Markierungsgruppen trägt, z.B. bei helikalen Trägern, zur Verbesserung der Signalstärke bei. Vorzugsweise betragen die Abstände zwischen Markierungsgruppen daher 3-6 oder/und 13-16 monomere Einheiten bei helikalen Trägern, z.B. einzel- oder insbesondere doppelsträngige Nukleinsäuren.

Das polymere Trägermolekül, das das Rückgrat des Konjugats

bildet, hat eine Länge von maximal 100 monomeren Einheiten, vorzugsweise von 3 - 80 monomeren Einheiten und besonders bevorzugt von 5 - 60 monomeren Einheiten.

Die monomeren Einheiten sind aus Aminosäuren, Nukleotiden und peptidischen Nukleinsäuren ausgewählt. Vorzugsweise umfaßt der polymere Träger eine aus Aminosäuren aufgebaute Peptidkette, vorzugsweise eine lineare Peptidkette. Der Träger kann jedoch auch eine aus Nukleotiden oder Nukleotidanaloga aufgebaute Nukleinsäurekette umfassen, an deren reaktiven Seitengruppen Haptenmoleküle und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen angekoppelt sind. Diese Nukleinsäurekette kann als Einzel- oder als Doppelstrang vorliegen. Bei doppelsträngigen Nukleinsäureträgern findet man oft eine Erhöhung der Signalstärke von Markierungsgruppen, z.B. eine verbesserte Quantenausbeute bei Fluoreszenzmarkierungsgruppen.

Weiterhin kann der polymere Träger aus peptidischen Nukleinsäuren (PNA) aufgebaut sein. Peptidische Nukleinsäuren umfassen ein Polyamidrückgrat aus gleichen oder verschiedenen monomeren Einheiten der Formel

$(\text{CH}_2)_k - \text{CHR}' - \text{N}[\text{CO} - (\text{CH}_2)_i - \text{L}] - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_m - \text{NH} - \text{CO} -$, wobei L aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, Phenyl, natürlich vorkommenden Nukleobasen und nicht natürlich vorkommenden Nukleobasen ausgewählt ist, R' aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff und den Seitenketten natürlich oder nicht natürlich vorkommender Aminosäuren, vorzugsweise α -Aminosäuren ausgewählt ist, k und m jeweils unabhängig 0 oder 1 sind und i unabhängig von 0 bis 5 ist. Die Haptenmoleküle und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen können an die Nukleobasen- oder/und Aminosäureseitenketten der peptidischen Nukleinsäure gekoppelt sein. Peptidische Nukleinsäuren und ihre Herstellung sind in WO92/20703 beschrieben. Auf diese Offenbarung wird hiermit Bezug genommen.

Auch bei peptidischen Nukleinsäuren kann der Träger als Einzel- oder Doppelstrang vorliegen. Besonders bevorzugt sind doppel-

strängige Träger mit mindestens einem PNA-Strang, z.B. einem PNA-Strang und einem Nukleinsäurestrang, z.B. einem DNA-Strang.

Das Konjugat enthält 1-10 Haptenmoleküle, vorzugsweise 1-6 Haptenmoleküle und besonders bevorzugt 1 oder 2 Haptenmoleküle. Das Hapten ist vorzugsweise ein immunologisch reaktives Molekül mit einer Molekularmasse von 100-2000 Da. Derartige Haptene können z.B. aus pharmakologischen Wirkstoffen, wie etwa Antibiotika, Opiaten, Amphetaminen, Barbituraten, Cytostatika (z.B. Gentamicin, Tobramycin, Vancomycin etc.), Paracetamol, Salicylaten, Phenytoin, Chinin und Chininderivaten, Theophyllin etc., Hormonen und Metaboliten wie etwa Sterinen, Gallensäuren, Sexualhormonen (z.B. Estradiol, Estriol, Testosteron, Progesteron, Pregnenolon und Derivate davon), Corticoiden (z.B. Cortisol, Corticosteron, Cortison und Derivate davon), Cardenoliden und Cardenolid-Glycosiden (z.B. Digoxin, Digoxigenin, Strophanthin, Bufadienolide etc.) Steroid-Sapogeninen, Steroidalkaloiden, Peptidhormonen, Creatinin, Schilddrüsenhormonen (z.B. T_3 , T_4), Neurotransmittern (z.B. Serotonin, Cholin, γ -Aminobuttersäure), Vitaminen und Mediatoren wie etwa Prostaglandinen, Leukotrienen, Leuko-En-diinen und Thromboxanen ausgewählt werden.

Andererseits kann das Hapten auch aus immunologisch reaktiven Peptidepitopen ausgewählt werden, die eine Länge von vorzugsweise bis zu 30 Aminosäuren besitzen. Derartige Peptidepitope können beispielsweise aus pathogenen Organismen, z.B. Bakterien, Viren und Protozoen oder aus Autoimmun-Antigenen, stammen. Beispielsweise können die immunologisch reaktiven Peptidepitope aus viralen Antigenen, z.B. den Aminosäuresequenzen von HIV I, HIV II oder Hepatitis C-Virus (HCV), stammen.

Außerdem kann das Hapten auch aus Nukleinsäuren mit einer Länge von vorzugsweise bis zu 50 Nukleotiden ausgewählt sein, die zu einer Nukleinsäuresequenz, die in der Probe nachgewiesen werden soll, komplementär sind. Schließlich kann das Hapten auch aus peptidischen Nukleinsäuren mit einer Länge von bis zu 50 Monomereinheiten ausgewählt sein.

Weiterhin enthält das erfindungsgemäße Konjugat 1-10, vorzugsweise 2-8 Markierungs- oder Festphasenbindungsgruppen. Bevorzugte Beispiele für Markierungsgruppen sind lumineszierende Metallchelate und Fluoreszenzmarkierungen. Bevorzugte Beispiele für Festphasenbindungsgruppen sind Biotin und Biotinanaloga, wie etwa Desthiobiotin und Imminobiotin, die eine spezifische Reaktion mit Streptavidin oder Avidin eingehen können.

Die Haptenmoleküle und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen sind vorzugsweise über reaktive Amino- oder/und Thiolseitengruppen, besonders bevorzugt über reaktive primäre Aminoseitengruppen an die Trägerkette gekoppelt. Derartige Seitengruppen können durch Einbau von entsprechenden Monomeren, z.B. Aminosäuren wie etwa Lysin, Ornithin, Hydroxylysin oder Cystein, in die Trägerkette erzeugt werden.

In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann es bevorzugt sein, wenn ein Spacer zwischen das Hapten bzw. die Markierungs- oder Festphasenbindungsgruppe und die Trägerkette eingebaut wird. Der Spacer ist vorzugsweise flexibel und hat eine Kettenlänge von vorzugsweise 3-30 Atomen. Besonders bevorzugt enthält der Spacer hydrophile Gruppen, z.B. Oxyalkylen- oder/und Hydroxy-Seitengruppen.

Bevorzugte Markierungsgruppen sind lumineszierende Metallchelate, d.h. Metallchelate, die eine nachweisbare Lumineszenzreaktion erzeugen. Der Nachweis dieser Lumineszenzreaktion kann beispielsweise durch Fluoreszenz- oder durch Elektrochemilumineszenzmessung erfolgen. Das Metall dieser Metallchelate ist beispielsweise ein Übergangsmetall oder ein Seltenerdenmetall. Vorzugsweise ist das Metall Ruthenium, Osmium, Rhenium, Iridium, Rhodium, Platin, Indium, Palladium, Molybdän, Technetium, Kupfer, Chrom oder Wolfram. Besonders bevorzugt sind Ruthenium, Iridium, Rhenium, Chrom und Osmium. Am meisten bevorzugt ist Ruthenium.

Die Liganden, die zusammen mit dem Metall das Metallchelat bilden, sind üblicherweise Polydentat-Liganden, d.h. Liganden mit

mehreren Koordinationsstellen. Polydentat-Liganden umfassen beispielsweise aromatische und aliphatische Liganden. Geeignete aromatische Polydentat-Liganden beinhalten aromatische heterocyclische Liganden. Bevorzugte aromatische heterocyclische Liganden sind N-haltige Polyheterocyclen wie etwa z.B. Bipyridyl, Bipyrazyl, Terpyridyl und Phenanthrolyl. Diese Liganden können beispielsweise Substituenten wie etwa Alkyl, substituiertes Alkyl, Aryl, substituiertes Aryl, Aralkyl, Carboxylat, Carboxyaldehyd, Carboxamid, Cyano, Amino, Hydroxy, Imino, Hydroxycarbonyl, Aminocarbonyl, Amidin, Guanidinium, Ureid, schwefelhaltige Gruppen, phosphorhaltige Gruppen und die Carboxylatester von N-Hydroxysuccinimid umfassen. Bevorzugte Liganden enthalten C₂-C₃-Alkylenoxy-, C₂-C₃-Alkylenthio- und C₂-C₃-Alkylenaminogruppen, insbesondere Ethylenoxygruppen. Das Chelat kann auch einen oder mehrere Monodentat-Liganden enthalten. Beispiele von Monodentat-Liganden umfassen Kohlenmonoxid, Cyanide, Isocyanide, Halogenide und aliphatische, aromatische und heterocyclische Phosphine, Amine, Stilbene und Arsine.

Besonders bevorzugt wird das lumineszierende Metallchelate ausgewählt aus Metallchelaten mit Bipyridyl- oder Phenanthrolyl-Liganden. Beispiele geeigneter Metallchelate und ihre Herstellung sind in EP-A-0 178 450, EP-A-0 255 534, EP-A-0 580 979 und WO 90/05301 beschrieben. Auf diese Offenbarung wird hiermit Bezug genommen. Am meisten bevorzugte Metallchelate sind Ruthenium-(bipyridyl)₃-Chelate. Diese Chelate sind in Form von Aktivesterderivaten kommerziell erhältlich, z.B. von Igen Inc. (Rockville, MD, USA).

Bei Verwendung eines lumineszierenden Metallkomplexes, der durch eine Elektrochemilumineszenz-Reaktion nachweisbar ist, als Markierungsgruppe hat sich der Einbau von mindestens einem positiven oder/und negativen Ladungsträger, z.B. Amino- oder Carboxylatgruppen, in die Trägerkette oder/und in den Spacer zwischen Metallkomplex und Trägerkette als günstig erwiesen. Besonders bevorzugt enthält die Trägerkette eine oder mehrere negative Ladungen, die z.B. durch Einbau von Glutaminsäure oder

Asparaginsäure während der Synthese erzeugt werden können. Auch bei anderen Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen, z.B. Fluoreszenzgruppen oder Biotin, kann der Einbau von Ladungsträgern in die Trägerkette oder/und in einen Spacer bevorzugt sein.

Ein weiteres Beispiel für bevorzugte Markierungsgruppen sind Fluoreszenzmarkierungen, wie etwa Fluorescein, Cumarin, Rhodamin, Resorufin, Cyanin und Derivate davon. Bei Verwendung von fluoreszierenden Markierungsgruppen hat sich eine helikale Struktur des Trägerrückgrats als günstig erwiesen, welche die Fluoreszenzmarkierungsgruppen hinsichtlich Raumorientierung und Abstand fixiert, um eine Fluoreszenzlöschung durch einen Energietransfer zu verhindern. Beispiele für Monomere, die eine geeignete helikale Struktur ergeben, sind Prolin oder ein peptidisches Nukleinsäurederivat mit einer Prolinseitengruppe.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Konjugate erfolgt durch ein Verfahren, bei dem man einen polymeren Träger, vorzugsweise einen Peptidträger aus monomeren Einheiten an einer Festphase synthetisiert, wobei man (a) während der Synthese an vorbestimmten Positionen des Trägers Monomerderivate einführt, die kovalent mit Haptenmolekülen oder/und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen gekoppelt sind, oder/und (b) nach der Synthese aktivierte Haptenmoleküle oder/und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen an reaktive Seitengruppen des Trägers koppelt.

Bei Variante (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird während der Festphasensynthese ein Monomerderivat eingeführt, das kovalent, vorzugsweise über eine primäre Aminoseitengruppe einer basischen Aminosäure wie Lysin oder Ornithin oder über eine Thiolseitengruppe einer Aminosäure wie Cystein mit einem Haptenmolekül oder/und einer Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppe gekoppelt ist. Die Herstellung entsprechender Monomerderivate kann beispielsweise durch Kopplung eines aktivierten Haptenmoleküls oder einer aktivierten Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppe, z.B. eines Aktivesterderivats an

eine freie primäre Aminogruppe oder eines Maleimidderivats an eine freie Thiolgruppe von gegebenenfalls partiell geschützten Monomerderivaten, z.B. Aminosäurederivaten, erfolgen. In Abb. 1 ist ein bevorzugtes Metallchelate-gekoppeltes Lysinderivat gezeigt. In Abb. 2 ist ein biotinyliertes Lysinderivat gezeigt.

Der Begriff "Aktivester" im Sinne der vorliegenden Erfindung umfaßt aktivierte Estergruppen, die mit freien Aminogruppen von Peptiden unter solchen Bedingungen reagieren können, daß keine störenden Nebenreaktionen mit anderen reaktiven Gruppen des Peptids auftreten können. Vorzugsweise wird als Aktivesterderivat ein N-Hydroxysuccinimidester verwendet. Neben den N-Hydroxysuccinimidestern können auch analoge p-Nitrophenyl-, Pentafluorphenyl-, Imidazolyl- oder N-Hydroxybenzotriazolylester verwendet werden.

Die Herstellung von Hapten-, Markierungsgruppen- und Festphasenbindungsgruppenderivaten, die sich für den Einbau in Oligonukleotidträger eignen, ist bei Theisen et al. (Tetrahedron Letters 33 (1992), 5033-5036) am Beispiel des Fluoreszenzfarbstoffs 5-Carboxyfluorescein beschrieben, der zu einem Phosphoramiditderivat umgesetzt wird. Dieses Phosphoramiditderivat kann an das 5'-Ende oder/und das 3'-Ende von Oligonukleotiden oder innerhalb der Oligonukleotidsequenz eingebaut werden.

Gemäß Variante (b) des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Kopplung der einführenden Gruppe nach Abspaltung von Schutzgruppen der zur Festphasensynthese verwendeten Monomerderivate vorzugsweise an Amino- oder/und Thiol-Seitengruppen, besonders bevorzugt an primäre Aminoseitengruppen des Trägers.

Vorzugsweise erfolgt die Einführung von Haptenen und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen gemäß Variante (a), d.h. durch Verwendung von mit der jeweils einzuführenden Gruppe gekoppelten Monomerderivaten während der Festphasensynthese. Gemäß dieser Variante können beispielsweise lumineszierende Metallchelate, Biotin oder Peptidhaptene ohne weiteres eingeführt werden. Bei

empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffen oder -markierungen oder anderen Haptenen, wie etwa Steroiden, ist diese Vorgehensweise jedoch weniger bevorzugt, da diese Substanzen durch die bei der Festphasensynthese herrschenden Bedingungen zerstört werden können. In diesem Falle erfolgt die Herstellung der Konjugate vorzugsweise gemäß Verfahrensvariante (b), d.h. durch nachträgliche Kopplung an das fertige Trägermolekül. Natürlich ist eine Kombination der Verfahrensvarianten (a) und (b) möglich.

Auch die Einführung zwei verschiedener Gruppen gemäß Variante (b), d.h. nach Beendigung der Synthese, z.B. eines Haptens und einer Markierungsgruppe oder eines Hapten und einer Festphasenbindungsgruppe, ist möglich. Hierzu kann das Verfahren nach Variante (b) beispielsweise derart durchgeführt werden, daß die erste einzuführende Gruppe an Amino- und die zweite einzuführende Gruppe an Thiolseitengruppen des Trägermoleküls gekoppelt wird. Andererseits können beide einzuführenden Gruppen jeweils selektiv an vorbestimmte primäre Aminoseitengruppen des Trägers gekoppelt werden, wobei an Positionen des Trägers, an denen eine Kopplung mit Haptenmolekülen erfolgen soll, ein Monomerderivat mit einer ersten Schutzgruppe für die Aminoseitengruppe verwendet wird, und an Positionen des Trägers, an denen eine Kopplung mit Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen erfolgen soll, ein Monomerderivat mit einer zweiten Schutzgruppe für die Amino-seitengruppe verwendet wird und die erste und die zweite Schutzgruppe so ausgewählt werden, daß eine selektive Schutzgruppenabspaltung und demzufolge eine selektive Kopplung in zwei Reaktionsschritten möglich ist. Hierzu können die erste und zweite Schutzgruppe aus säurelabilen Aminoschutzgruppen, wie etwa Boc bzw. säurestabilen Schutzgruppen, wie etwa Phenylacetyl ausgewählt werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird das Trägermolekül mit der gewünschten Monomersequenz an einer Festphase hergestellt. Die Herstellung von Peptidträgern erfolgt vorzugsweise mit einem kommerziellen Peptid-Synthesegerät (z.B. die Geräte A 431 oder A 433 von Applied Biosystems). Die Synthese erfolgt nach

bekannten Methoden, vorzugsweise ausgehend vom Carboxylterminus des Peptids unter Verwendung von Aminosäurederivaten. Vorzugsweise werden Aminosäurederivate eingesetzt, deren für die Kupplung benötigte Amino-Endgruppe mit einem Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc)-Rest derivatisiert ist. Reaktive Seitengruppen der eingesetzten Aminosäuren enthalten Schutzgruppen, die nach Beendigung der Peptidsynthese ohne weiteres abspaltbar sind. Bevorzugte Beispiele hierfür sind Schutzgruppen, wie etwa Triphenylmethyl (Trt), t-Butylether (tBu), t-Butylester (OtBu), tert.-Butoxycarbonyl (Boc), 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc) oder Phenylacetyl.

Die Aminoseitenketten von Lysinresten oder anderen Aminosäurederivaten mit primären Aminoseitengruppen, die sich an Positionen des Peptids befinden, an denen ein Hapten oder eine Markierung eingeführt werden soll, sind gemäß Variante (a) kovalent mit der einzuführenden Gruppe gekoppelt.

Neben den 20 natürlichen Aminosäuren kann das Peptid auch artefizielle Aminosäuren, wie etwa β -Alanin, γ -Aminobuttersäure, ϵ -Aminocaprinsäure, Norleucin oder Ornithin enthalten. Diese artefiziellen Aminosäuren werden analog wie die natürlichen Aminosäuren für die Synthese in geschützter Form eingesetzt.

Gemäß Variante (b) des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt nach Beendigung der Synthese die Einführung des Haptens bzw. der Markierung durch Umsetzung des Peptids nach Schutzgruppenabspaltung mit der jeweils gewünschten aktivierten Gruppe, die mit freien primären Aminogruppen des Peptids reagiert. Pro freie primäre Aminogruppe werden vorzugsweise 1,5 bis 4 Äquivalente Aktivester eingesetzt. Anschließend wird das Reaktionsprodukt aufgereinigt, vorzugsweise durch HPLC. Die Einführung von zwei unterschiedlichen aktivierten Gruppen gemäß Variante (b) gelingt durch Verwendung von zwei selektiv abspaltbaren Schutzgruppen, wie oben erläutert.

Das Peptidrückgrat des Konjugats besitzt eine nicht immunologisch

reaktive Aminosäuresequenz, d.h. eine Aminosäuresequenz, die bei der vorgesehenen Anwendung des Konjugats als Antigen in einem immunologischen Nachweisverfahren die Durchführung des Tests nicht beeinträchtigt.

Andererseits kann das Rückgrat des Trägermoleküls auch aus Nukleotiden oder peptidischen Nukleinsäuren aufgebaut sein. Die Synthese eines Oligonukleotidträgermoleküls kann in einem kommerziellen DNA-Synthesegerät erfolgen. Die Haptenmoleküle und die Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen werden vorzugsweise als Phosphoramiditderivate eingeführt (Theisen et al., supra; Applied Biosystems, User Bulletin 67, FAM Amidite, Mai 1992) oder/und nachträglich an freie reaktive Seitengruppen gekoppelt. Die Synthese von Trägermolekülen auf Basis peptidischer Nukleinsäuren erfolgt analog einer Festphasenpeptidsynthese, z.B. gemäß der in WO92/20703 beschriebenen Methode. Die Einführung von Haptenmolekülen oder Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen kann entsprechend den für Peptid- und Oligonukleotidträger beschriebenen Methoden erfolgen.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung der Konjugate als Antigene in einem immunologischen Verfahren, wenn das Haptenmolekül ein immunologisch reaktives Molekül ist, oder zur DNA-Diagnostik, wenn das Hapten eine Nukleinsäure ist.

Konjugate, die mehr als 1 Haptenmolekül enthalten, können in immunologischen Nachweisverfahren als Polyhaptene eingesetzt werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung der Konjugate in einem immunologischen Verfahren zur Bestimmung von spezifischen Antikörpern in einer Probenflüssigkeit. Vorzugsweise werden solche Antikörper bestimmt, die auf eine Infektion durch Mikroorganismen, wie etwa Bakterien, Viren oder Protozoen, hinweisen. Besonders bevorzugt werden gegen Viren gerichtete Antikörper, z.B. gegen HIV oder Hepatitis-Viren gerichtete Antikörper bestimmt. Die Probenflüssigkeit ist vorzugs-

weise Serum, besonders bevorzugt humanes Serum. Weiterhin ist bevorzugt, daß die erfindungsgemäßen Konjugate bei einem immunologischen Verfahren im Brückentestformat eingesetzt werden.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur immunologischen Bestimmung eines spezifischen Antikörpers in einer Probeflüssigkeit, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man (a) die Probeflüssigkeit mit mindestens einem erfindungsgemäßen Konjugat, das gegen den zu bestimmenden Antikörper gerichtet ist, inkubiert und (b) den Antikörper über eine Bindung mit dem Peptid nachweist.

Das erfindungsgemäße immunologische Bestimmungsverfahren kann an sich nach jedem bekannten Testformat erfolgen, z.B. in einem homogenen Immunoassay mit einer einzigen Reaktionsphase oder in einem heterogenen Immunoassay mit mehr als einer Reaktionsphase. Vorzugsweise wird ein heterogenes Testformat verwendet, bei dem das Vorhandensein des Antikörpers in Anwesenheit einer Festphase nachgewiesen wird. Eine Ausführungsform dieses Testformats ist das sogenannte Doppelantigen-Brücken-Testkonzept. Hierbei wird die Probeflüssigkeit in Gegenwart einer reaktiven Festphase mit zwei gegen den zu bestimmenden Antikörper gerichteten Antigenen inkubiert, wobei das erste Antigen eine Markierungsgruppe trägt und das zweite Antigen an die Festphase gebunden ist oder in einer an die Festphase bindefähigen Form vorliegt. Das erste oder/und das zweite Antigen ist ein erfindungsgemäßes Konjugat. Der zu bestimmende Antikörper in der Probeflüssigkeit wird gegebenenfalls nach Abtrennen der Festphase von der Inkubationsflüssigkeit durch Bestimmung der Markierung in der Festphase oder/und in der flüssigen Phase nachgewiesen. Vorzugsweise ist das erste Antigen ein mit einem lumineszierenden Metallchelate oder einer Fluoreszenzgruppe markiertes Konjugat. Das zweite Antigen ist vorzugsweise mit Biotin markiert und ist an eine Festphase bindefähig, die mit Streptavidin oder Avidin beschichtet ist.

Die Testdurchführung beinhaltet vorzugsweise ein Mischen der

Probeflüssigkeit mit dem ersten markierten Antigen und dem festphasenseitigen zweiten Antigen, um einen markierten, immobilisierten Komplex aus erstem Antigen, Antikörper und festphasengebundenem zweiten Antigen zu erhalten. Gegenüber anderen Testformaten zum Nachweis von Antikörpern führt das Brückentestformat sowohl zu einer Verbesserung der Sensitivität, d.h. es werden alle Immunglobulinklassen, wie etwa IgG, IgM, IgA und IgE, erkannt, als auch der Spezifität, d.h. es wird die unspezifische Reaktivität verringert.

Eine zweite bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung der Konjugate in einem kompetitiven Immunoassay. Kompetitive Immunoassays werden im allgemeinen zum Nachweis von niedermolekularen Analyten verwendet und können prinzipiell in zwei Testformaten, dem "labelled antibody" Format und dem "labelled analog" Format durchgeführt werden. Beim "labelled antibody" Format wird die den nachzuweisenden Analyten enthaltende Probeflüssigkeit mit einem an eine Festphase bindefähigen Hapten, das mit dem Analyten immunologisch konkurriert, und einen markierten, gegen das Hapten und den Analyten gerichteten Rezeptor, z.B. einen Antikörper, markiert. Bei diesem Testformat ist die an die Festphase gebundene Markierung umgekehrt proportional zur Konzentration des Analyten. Beim "labelled analog" Format wird die den nachzuweisenden Analyten enthaltende Probeflüssigkeit mit einem markierten, mit dem Analyten immunologisch konkurrierenden Hapten und einem gegen den Analyten und das Hapten gerichteten Rezeptor, der an eine Festphase bindefähig ist, inkubiert. Die Menge an festphasengebundenem markiertem Hapten ist dann der Konzentration an freiem, zu bestimmendem Analyten umgekehrt proportional.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probeflüssigkeit nach dem Prinzip des kompetitiven Immunoassay im "labelled analog" Format, dadurch gekennzeichnet, daß man (a) die Probeflüssigkeit in Gegenwart einer reaktiven Festphase mit einem erfindungsgemäßen Konjugat, das eine Markierungsgruppe enthält, und einem Rezeptor,

der an die Festphase gebunden oder zur Bindung an eine Festphase fähig ist und eine spezifisch immunologische Reaktion mit dem Analyten und der Hapten- komponente des Konjugats eingehen kann, inkubiert, (b) die Festphase gegebenenfalls von der Inkubationsflüssigkeit abtrennt und (c) das Vorhandensein oder/und die Menge des Analyten in der Probeflüssigkeit durch Messung der Markierungskomponente des Konjugats in der Festphase oder/und in der Inkubationsflüssigkeit bestimmt. Als immobilisierbaren Rezeptor verwendet man vorzugsweise einen biotinylierten Antikörper bzw. ein biotinyliertes Antikörperfragment und als reaktive Festphase eine mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probeflüssigkeit nach dem Prinzip des kompetitiven Immunoassay im "labelled antibody" Format, dadurch gekennzeichnet, daß man (a) die Probeflüssigkeit in Gegenwart einer reaktiven Festphase mit einem erfindungsgemäßen Konjugat, das eine Festphasenbindungsgruppe enthält, und einem Rezeptor, der eine Markierungsgruppe trägt und eine spezifisch immunologische Reaktion mit dem Analyten und der Haptenkomponente des Konjugats eingehen kann, inkubiert, (b) die Festphase gegebenenfalls von der Inkubationsflüssigkeit abtrennt und (c) das Vorhandensein oder/und die Menge des Analyten in der Probeflüssigkeit durch Messung der Markierungskomponente des Rezeptors an der Festphase oder/und in der Inkubationsflüssigkeit bestimmt. Vorzugsweise verwendet man ein biotinyliertes Konjugat und eine mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase. Als markierten Rezeptor verwendet man vorzugsweise einen Antikörper bzw. ein Antikörperfragment.

Der Nachweis von lumineszierenden Metallchelatgruppen erfolgt vorzugsweise durch Elektrochemilumineszenz, wobei lumineszierende Spezies elektrochemisch an der Oberfläche einer Elektrode erzeugt werden. Der Nachweis der Lumineszenz kann qualitativ oder/und quantitativ erfolgen. Beispiele zur Durchführung von Lumineszenz-Assays finden sich in EP-A-0 580 979, WO 90/05301, WO 90/11511 und WO 92/14138. Auf die dort offenbarten Verfahren und Vor-

richtungen für Lumineszenz-Assays wird hiermit Bezug genommen. Die Festphase in Elektrochemilumineszenz-Assays besteht vorzugsweise aus Mikropartikeln, besonders bevorzugt magnetischen Mikropartikeln, die mit einer Beschichtung versehen sind, die mit dem festphasenseitigen zweiten Antigen wechselwirkt. Vorzugsweise sind die Mikropartikel mit Streptavidin beschichtet.

Die Elektrochemilumineszenz-Messung wird vorzugsweise in Gegenwart eines Reduktionsmittels für den Metallkomplex durchgeführt, z.B. einem Amin. Bevorzugt sind aliphatische Amine, insbesondere primäre, sekundäre und tertiäre Alkylamine, deren Alkylgruppen jeweils ein bis drei Kohlenstoffatome aufweist. Besonders bevorzugt ist Tripropylamin. Das Amin kann jedoch auch ein aromatisches Amin, wie Anilin oder ein heterocyklisches Amin sein.

Weiterhin kann gegebenenfalls als Verstärker ein nichtionisches oberflächenaktives Mittel, z.B. ein ethoxyliertes Phenol vorhanden sein. Derartige Substanzen sind beispielsweise kommerziell unter den Bezeichnungen Triton X100 oder Triton N-401 erhältlich.

Andererseits kann der Nachweis der lumineszierenden Metallchelatgruppe auch durch Fluoreszenz erfolgen, wobei das Metallchelat durch Bestrahlung mit einem Licht der geeigneten Wellenlänge angeregt und die daraus resultierende Fluoreszenzstrahlung gemessen wird. Beispiele zur Durchführung von Fluoreszenz-Assays finden sich in EP-A-0 178 450 und EP-A-0 255 534. Auf diese Offenbarung wird hiermit Bezug genommen.

Der Nachweis von Fluoreszenzgruppen, die ebenso wie die lumineszierenden Metallchelate zu den bevorzugten Markierungsgruppen der erfindungsgemäßen Konjugate gehören, kann - wie zuvor ausgeführt - durch Anregung und Messung der Fluoreszenz auf bekannte Weise erfolgen.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein

immunologisches Reagenz, das mindestens ein erfindungsgemäßes markiertes oder festphasenbindefähiges Konjugat enthält. Ein Reagenz zur immunologischen Bestimmung eines spezifischen Antikörpers nach dem Prinzip des Doppelantigen-Brückentests enthält (a) ein markiertes erfindungsgemäßes Konjugat oder/und (b) ein weiteres erfindungsgemäßes Konjugat, das an eine Festphase gebunden ist oder in einer an eine Festphase bindefähigen Form vorliegt.

Ein Reagenz zur Bestimmung eines Analyten, vorzugsweise eines niedermolekularen Analyten nach dem Prinzip des kompetitiven Immunoassays enthält ein markiertes Konjugat ("labelled analog"-Format) oder ein festphasenbindefähiges Konjugat ("labelled antibody"-Format), das mit dem zu bestimmenden Analyten immunologisch um die Bindung an einen Rezeptor konkurriert. Vorzugsweise enthält das Reagenz für einen kompetitiven Immunoassay räumlich getrennt vom erfindungsgemäßen Konjugat entweder einen markierten Rezeptor ("labelled antibody"-Format) oder einen festphasenbindefähigen Rezeptor ("labelled analog"-Format), der mit dem zu bestimmenden Analyten und dem erfindungsgemäßen Konjugat eine immunologische Reaktion eingehen kann.

Die Erfindung wird weiterhin durch die folgenden Beispiele und Abbildungen erläutert. Es zeigen:

- Abb. 1 ein Metallchelate-Lysin-Derivat,
- Abb. 2 ein Biotin-Lysin-Derivat,
- Abb. 3 ein erfindungsgemäßes Konjugat
- Abb. 4 ein Vergleichskonjugat.

Beispiel 1

Herstellung eines Metallchelate-Lysin-Derivats

6 mmol des Rutheniumkomplexes $\text{Ru}(\text{Bipyridin})_2$ (Bipyridin-CO-N-hydroxysuccinimidester) gemäß EP-A-0 580 979 wurden in 50 ml Dimethylformamid gelöst und dazu eine Lösung von α -Fmoc-Lysin getropft. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde der Rückstand

in wenig Aceton gelöst, mit 300 ml Chloroform versetzt und kurz zum Sieden erhitzt. Nach Abtrennen des Lösungsmittels wurde die in Abb. 1 gezeigte Verbindung als Feststoff erhalten.

Beispiel 2

Herstellung von Metallchelate-markierten und biotinylierten Peptiden

Die Metallchelate-markierten bzw. biotinylierten Peptide wurden mittels Fluorenylmethyloxycarbonyl-(Fmoc)-Festphasenpeptidsynthese an einem Batch-Peptidsynthesizer, z.B. von Applied Biosystems A431 oder A433, hergestellt. Dazu wurden jeweils 4.0 Äquivalente der in Tabelle 1 dargestellten Aminosäurederivate verwendet:

Tabelle 1:

A	Fmoc-Ala-OH
C	Fmoc-Cys(Trt)-OH
D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH
E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH
F	Fmoc-Phe-OH
G	Fmoc-Gly-OH
H	Fmoc-His(Trt)-OH
I	Fmoc-Ile-OH
K	Fmoc-Lys(Boc)-OH
L	Fmoc-Leu-OH
M	Fmoc-Met-OH
N	Fmoc-Asn(Trt)-OH
P	Fmoc-Pro-OH
Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH
R	Fmoc-Arg(Pmc)-OH
S	Fmoc-Ser(tBu)-OH
T	Fmoc-Thr(tBu)-OH

U	Fmoc- β -Alanin-OH
V	Fmoc-Val-OH
W	Fmoc-Trp-OH
Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH
Z	Fmoc- ϵ -Aminocapronsäure-OH
Nle	Fmoc- ϵ -Norleucin-OH
Abu	Fmoc- γ -Aminobuttersäure-OH

Die Einführung von Metallchelate- und Biotingruppen in die Peptidsequenz erfolgte durch direkten Einbau von Metallchelate- oder Biotin-gekoppelten Aminosäurederivaten, z.B. innerhalb der Sequenz über einen mit Metallchelate-Aktivester ϵ -derivatisierten Lysinrest (Abb. 1) bzw. über einen mit Biotin derivatisierten Lysinrest (Abb. 2) oder N-terminal durch Verwendung eines entsprechenden α -derivatisierten Aminosäurerests.

Die Aminosäuren oder Aminosäurederivate wurden in N-Methylpyrrolidon gelöst. Das Peptid wurde an 400-500 mg 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-Aminomethyl)-Phenoxy-Harz (Tetrahedron Letters 28 (1987), 2107) mit einer Beladung von 0,4-0,7 mmol/g aufgebaut (JACS 95 (1973), 1328). Die Kupplungsreaktionen wurden bezüglich des Fmoc-Aminosäurederivats mit 4 Äquivalenten Dicyclohexylcarbodiimid und 4 Äquivalenten N-Hydroxybenzotriazol in Dimethylformamid als Reaktionsmedium während 20 min durchgeführt. Nach jedem Syntheseschritt wurde die Fmoc-Gruppe mit 20%igem Piperidin in Dimethylformamid in 20 min abgespalten.

Die Freisetzung des Peptids vom Träger und die Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen erfolgte mit 20 ml Trifluoressigsäure, 0,5 ml Ethandithiol, 1 ml Thioanisol, 1,5 g Phenol und 1 ml Wasser in 40 min bei Raumtemperatur. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit 300 ml gekühltem Diisopropylether versetzt und zur vollständigen Fällung des Peptids 40 min bei 0°C gehalten. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Diisopropylether nachgewaschen, mit wenig 50 %-iger Essigsäure gelöst und lyophilisiert.

Das erhaltene Rohmaterial wurde mittels präparativer HPLC an Delta-PAK RP C18-Material (Säule 50 x 300 mm, 100 Å, 15 µ) über einen entsprechenden Gradienten (Eluent A: Wasser, 0,1% Trifluoressigsäure, Eluent B: Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure) in ca. 120 min. aufgereinigt. Die Identität des eluierten Materials wurde mittels Ionenspray-Massenspektrometrie geprüft.

Die Entfernung von säurestabilen Phenylacetylschutzgruppen erfolgte enzymatisch mit immobilisierter oder löslicher Penicillin G-Amidase in wäßriger Lösung mit organischem Solvensanteil bei Raumtemperatur.

Beispiel 3

Kopplung mit Haptenen

Das Metallchelat-markierte bzw. biotinylierte Peptid wurde in Dimethylformamid gelöst und bezüglich der kupplungsfähigen Positionen des Peptids (z.B. Aminoseitengruppen von Lysin) jeweils ein leichter Überschuß (ca. 30 %) des aktivierten Haptens (z.B. N-Hydroxysuccinimidester) zugefügt. Es wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel im Hochvakuum abgezogen und das Peptid über präparative HPLC gereinigt.

Unter Verwendung des in Abb. 1 gezeigten Metallchelat-Lysin-Derivats als Markierungsgruppe und von Estradiol (E2) als Hapten wurden Konjugate mit der folgenden Struktur hergestellt:

I: AcK(BPRu)UEUEUK(E2)UEUEUK(BPRu)UEUK(E2)-NH₂

II: AcK(BPRu)UEUEUK(E2)UEUEUK(BPRu)U-NH₂

Das Konjugat I ist in Abb. 3 dargestellt. Der Aminotерminus der Peptidketten ist durch Acetyl (Ac) geschützt. Der Carboxylterminus liegt als Säureamidgruppe vor.

Die Metallchelat- und Haptenmoleküle sind jeweils über die ε-Aminoseitengruppe der Lysine an die Peptidkette gekoppelt.

Auf analoge Weise wurde unter Verwendung von Testosteron als Haptenmolekül ein Konjugat mit der Sequenz von Konjugat I synthetisiert.

Die Struktur der hergestellten Konjugate wurde durch ^1H -NMR (500 MHz) überprüft und bestätigt.

Beispiel 4

Bestimmung von Estradiol in Serum

Es wurde ein kompetitiver Zweischnitt-Assay nach dem "labelled analog"-Format zur Bestimmung von Estradiol in Humanserum durchgeführt. Hierzu wurden 90 μl Lösung 1 (0,69 nmol/l erfindungsgemäßes Konjugat I (Abb. 3) bzw. 1,68 nmol/l Vergleichskonjugat (Abb. 4), jeweils in 50 mmol/l 4-Morpholinethansulfonsäure (MES), pH 6,8, 0,1 % Rinderserumalbumin, 0,1 % Thesit, 0,01 % Methylisothiazolon, 0,1 % Oxypyrion, 30 ng/ml Ablösereagenz Dihydrotestosteron) zusammen mit 50 μl Probe (Serumprobe oder Estradiol Standard) in einem Polystyrolgefäß 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die aufeinanderfolgende Zugabe von 90 μl Lösung 2 (0,7 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 1,4 $\mu\text{g/ml}$ Konjugat aus Biotin und polyklonalem Anti-Estradiol-Kaninchen-Fab' in 50 mmol/l MES-Puffer pH 6,0) und 50 μl Bead-Suspension (720 $\mu\text{g/ml}$ Streptavidin-beschichtete Magnetpartikel, Fa. Dynal).

Nach weiteren 10 min Inkubation bei 37°C wurden 150 μl der Mischung in eine Meßzelle überführt. Dort erfolgte eine magnetische Konzentrierung der Bead-Partikel und der daran haftenden Rutheniummarkierung an die Elektrodenoberfläche und eine Detektion des elektrochemisch erzeugten Chemilumineszenzsignals bei 28°C.

Das in Tabelle 2 dargestellte Ergebnis dieses Versuchs zeigt, daß das erfindungsgemäße Konjugat gegenüber dem Vergleichskonjugat eine deutliche Verbesserung der Testperformance hinsichtlich Sensitivität und unterer Nachweisgrenze bringt.

Tabelle 2

Antigen	Konjugat I (Erfindung)	Konjugat (Ver- gleich)
Antigenkonzentration (nmol/l)	0,69	1,68
Rutheniumkomplex-Konzentra- tion (nmol/l)	1,68	1,68
Konzentration Antiserum (µg/ml)	0,7	1,4
Counts Standard F	80412	87709
Counts Standard B	653420	1224219
Counts Standard A	861140	1445270
Verhältnis B/A	0,759	0,847
Verhältnis F/A	0,093	0,061
Verhältnis F/E	0,546	0,442
untere Nachweisgrenze pg/ml (3 % VK)	15,9	25,1

PATENTANSPRÜCHE

1. Konjugat, umfassend einen polymeren Träger mit maximal 100 monomeren Einheiten, der gekoppelt an reaktive Seitengruppen 1 - 10 Haptenmoleküle und 1 - 10 Markierungs- oder Festphasenbindungsgruppen enthält, wobei die monomeren Einheiten aus Aminosäuren, Nukleotiden, Nukleotidanaloga und peptidischen Nukleinsäuren ausgewählt sind.
2. Konjugat nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß der polymere Träger eine Länge von 3 - 80 monomeren Einheiten aufweist.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß der polymere Träger eine Länge von 5 - 60 monomeren Einheiten aufweist.
4. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß es 1 - 6 Haptenmoleküle enthält.
5. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß es 2 - 8 Markierungs- oder Festphasenbindungsgruppen enthält.
6. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der polymere Träger eine aus Aminosäuren aufgebaute Peptidkette umfaßt.
7. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-5,
dadurch gekennzeichnet,

daß der polymere Träger eine aus Nukleotiden oder/und Nukleotidanaloga aufgebaute Kette umfaßt.

8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-5,
dadurch gekennzeichnet,
daß der polymere Träger eine aus peptidischen Nukleinsäuren aufgebaute Kette umfaßt.
9. Konjugat nach Anspruch 7 oder 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß der polymere Träger als Doppelstrang vorliegt.
10. Konjugat nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Doppelstrang mindestens eine Kette enthält, die peptidische Nukleinsäuren umfaßt.
11. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Haptenmoleküle und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen über reaktive Amino- oder/und Thiol-Seiten-
gruppen an den polymeren Träger gekoppelt sind.
12. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß es Markierungsgruppen enthält, die aus lumineszierenden Metallchelaten oder Fluoreszenzgruppen ausgewählt sind.
13. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß es Festphasenbindungsgruppen enthält, die aus Biotin und Biotinanaloga ausgewählt sind.
14. Konjugat nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierungsgruppen lumineszierende Metallchelate sind und der polymere Träger mindestens einen positiven

oder/und negativen Ladungsträger enthält.

15. Konjugat nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierungsgruppen Fluoreszenzgruppen sind und
polymere Träger, eine im wesentlichen helikale Struktur
aufweist.
16. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Hapten ein immunologisch reaktives Molekül mit
einer Molekularmasse ≤ 2000 Da ist.
17. Konjugat nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Hapten aus pharmakologischen Wirkstoffen, Hormonen,
Metaboliten, Vitaminen, Mediatoren und Neurotransmittern
ausgewählt ist.
18. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Hapten aus immunologisch reaktiven Peptidpitopen
mit einer Länge bis zu 30 Aminosäuren ausgewählt ist.
19. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Hapten aus Nukleinsäuren mit einer Länge bis zu 50
Nukleotiden ausgewählt ist.
20. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Hapten aus peptidischen Nukleinsäuren mit einer
Länge bis zu 50 Monomereinheiten ausgewählt ist.
21. Verfahren zur Herstellung von Konjugaten nach einem der
Ansprüche 1 bis 20,
dadurch gekennzeichnet,

daß man einen polymeren Träger aus monomeren Einheiten an einer Festphase synthetisiert, wobei man

- (a) während der Synthese an vorbestimmten Positionen des Trägers Monomerderivate einführt, die kovalent mit Haptenmolekülen oder/und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen gekoppelt sind, oder/und
- (b) nach der Synthese aktivierte Haptenmoleküle oder/und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen an reaktive Seitengruppen des Trägers koppelt.

- 22. Verfahren nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen Peptidträger aus Aminosäurederivaten synthetisiert.
- 23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Variante (a) die Haptenmoleküle oder/und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen jeweils an eine primäre Aminogruppe oder eine Thiolgruppe des Monomerderivats gekoppelt sind.
- 24. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Variante (b) die Kopplung an Amino- oder/und Thiol-Seitengruppen des Trägers nach Abspaltung von Schutzgruppen der zur Festphasensynthese verwendeten Monomerderivate erfolgt.
- 25. Verfahren nach Anspruch 21, 22 oder 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß man nach der Synthese in Variante (b) die Haptenmoleküle und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen an primäre Amino-Seitengruppen des Trägers koppelt, wobei an Positionen des Trägers, an denen eine Kopplung mit Haptenmolekülen erfolgen soll, ein Monomerderivat mit einer ersten Schutzgruppe für die Amino-Seitengruppe verwendet

wird, und an Positionen des Trägers, an denen eine Kopplung mit Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen erfolgen soll, ein Monomerderivat mit einer zweiten Schutzgruppe für die Aminoseitengruppe verwendet wird und die erste und die zweite Schutzgruppe so ausgewählt werden, daß eine selektive Schutzgruppenabspaltung möglich ist.

26. Verfahren nach Anspruch 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß die erste und zweite Schutzgruppe aus säurelabilen bzw. säurestabilen Schutzgruppen ausgewählt werden.
27. Verwendung von Konjugaten nach einem der Ansprüche 1 bis 20 als Antigen in einem immunologischen Verfahren oder zur Nukleinsäure-Diagnostik.
28. Verwendung nach Anspruch 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Konjugate, die mehr als 1 Haptenmolekül enthalten, als Polyhaptene in immunologischen Nachweisverfahren einsetzt.
29. Verwendung nach Anspruch 27 oder 28 in einem kompetitiven Immunoassay.
30. Verwendung nach Anspruch 27 oder 28 in einem Immunoassay zum Nachweis spezifischer Antikörper.
31. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe-
flüssigkeit nach dem Prinzip des kompetitiven Immunoassay
im "labelled analog" Format,
dadurch gekennzeichnet,
daß man
 - (a) die Probeflüssigkeit in Gegenwart einer reaktiven
Festphase mit einem Konjugat nach einem der Ansprüche
1 bis 20, das eine Markierungsgruppe enthält, und
einem Rezeptor, der an die Festphase gebunden oder zur

Bindung an eine Festphase fähig ist und eine spezifisch immunologische Reaktion mit dem Analyten und der Haptenkomponente des Konjugats eingehen kann, inkubiert,

- (b) die Festphase gegebenenfalls von der Inkubationsflüssigkeit abtrennt und
- (c) das Vorhandensein oder/und die Menge des Analyten in der Probeflüssigkeit durch Messung der Markierungskomponente des Konjugats in der Festphase oder/und in der Inkubationsflüssigkeit bestimmt.

32. Verfahren nach Anspruch 31,

dadurch gekennzeichnet,

daß man als Rezeptor einen biotinylierten Antikörper bzw. ein biotinyliertes Antikörperfragment und eine mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase verwendet.

33. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probeflüssigkeit nach dem Prinzip des kompetitiven Immunoassay im "labelled antibody" Format,

dadurch gekennzeichnet,

daß man

- (a) die Probeflüssigkeit in Gegenwart einer reaktiven Festphase mit einem Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 20, das eine Festphasenbindungsgruppe enthält, und einem Rezeptor, der eine Markierungsgruppe trägt und eine spezifisch immunologische Reaktion mit dem Analyten und der Haptenkomponente des Konjugats eingehen kann, inkubiert,
- (b) die Festphase gegebenenfalls von der Inkubationsflüssigkeit abtrennt und
- (c) das Vorhandensein oder/und die Menge des Analyten in der Probeflüssigkeit durch Messung der Markierungskomponente des Rezeptors in der Festphase oder/und in der Inkubationsflüssigkeit bestimmt.

34. Verfahren nach Anspruch 33,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein biotinyliertes Konjugat und eine mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase verwendet.
35. Verfahren zum Nachweis eines spezifischen Antikörpers in einer Probeflüssigkeit,
dadurch gekennzeichnet,
daß man
- (a) die Probeflüssigkeit mit mindestens einem Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 20, das gegen den zu bestimmenden Antikörper gerichtet ist, inkubiert und
 - (b) den Antikörper über eine Bindung mit dem Konjugat nachweist.
36. Verfahren nach Anspruch 35,
dadurch gekennzeichnet,
daß man
- (a) die Probeflüssigkeit in Gegenwart einer reaktiven Festphase und zwei gegen den zu bestimmenden Antikörper gerichteten Antigenen inkubiert, wobei das erste Antigen eine Markierungsgruppe trägt und das zweite Antigen an die Festphase gebunden oder in einer an die Festphase bindefähigen Form vorliegt,
 - (b) die Festphase gegebenenfalls von der Inkubationsflüssigkeit abtrennt und
 - (c) das Vorhandensein oder/und die Menge des Antikörpers durch Bestimmung der Markierung in der Festphase oder/und in der flüssigen Phase nachweist,
- wobei man als erstes oder/und zweites Antigen ein Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 20 verwendet.
37. Verfahren nach Anspruch 36,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als erstes Antigen ein mit einem lumineszierenden Metallchelat oder einer Fluoreszenzgruppe markiertes Konjugat verwendet.

38. Verfahren nach Anspruch 36 oder 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als zweites Antigen ein biotinyliertes Konjugat und
eine mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase
verwendet.

1/2

Abb.1

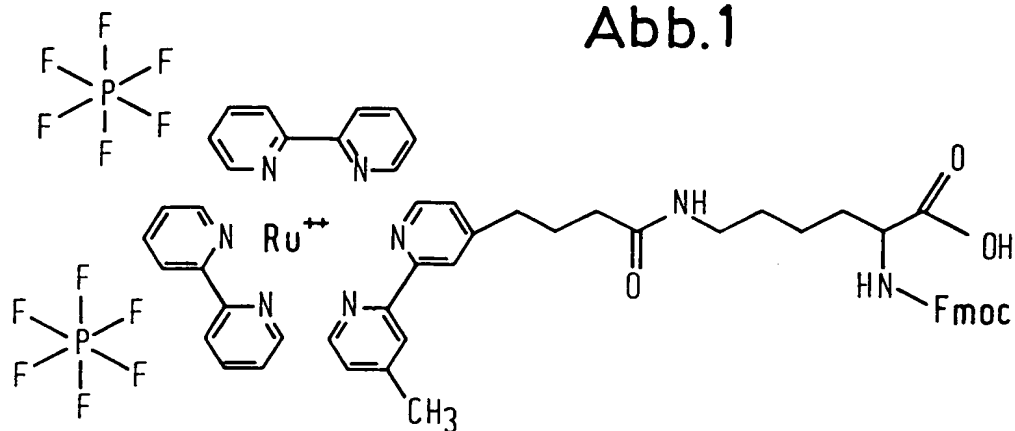


Abb.2

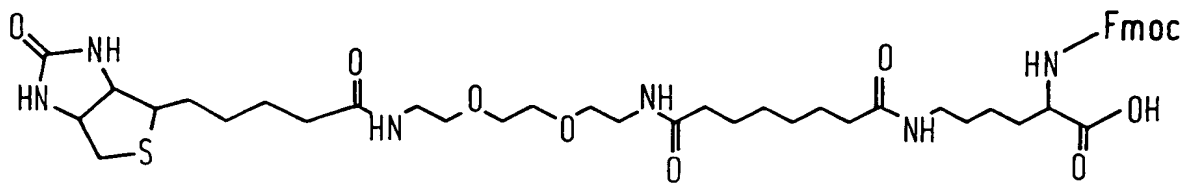


Abb. 3

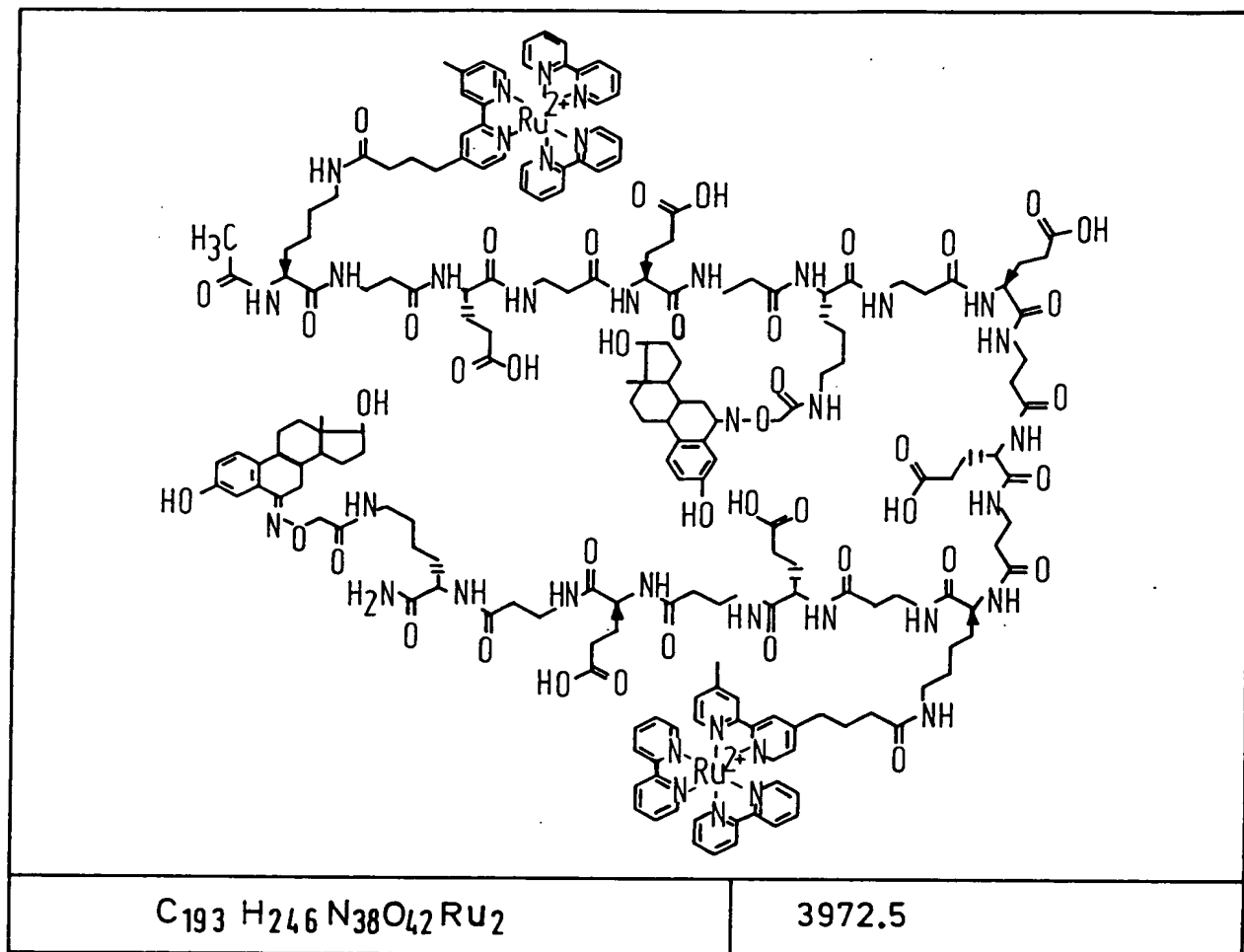
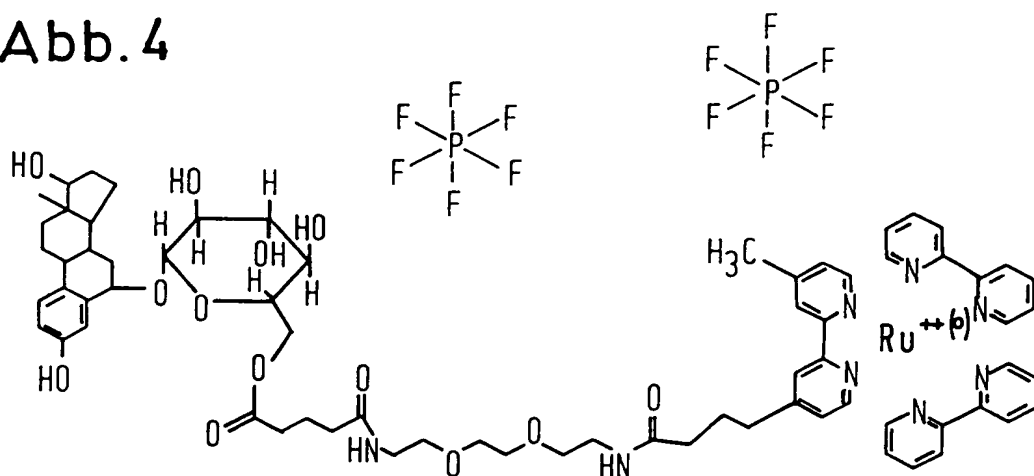


Abb. 4





v

.

.

.

.

PC, /EP 95/02915

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/58 C12Q1/68 G01N33/543

IPC 6 G01N C12Q

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 95/02915

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 178 450 (F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AG.) 23 April 1986 cited in the application see the whole document ---	7-38
Y	EP,A,0 154 884 (MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC.) 18 September 1985 cited in the application see the whole document ---	7-38
A	EP,A,0 155 224 (CHROMAGENICS, INC.) 18 September 1985 see the whole document -----	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PC/EP 95/02915

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-135071	27-03-85	EP-A, B 0134307	20-03-85
		JP-A- 60070359	22-04-85
		JP-C- 1831702	29-03-94
		JP-A- 60173469	06-09-85
		US-A- 4645646	24-02-87
		US-A- 4657873	14-04-87

EP-A-507587	07-10-92	JP-A- 5126829	21-05-93

EP-A-178450	23-04-86	CA-A- 1261744	26-09-89
		JP-B- 6090201	14-11-94
		JP-A- 61073066	15-04-86
		US-A- 5075447	24-12-91
		US-A- 4745076	17-05-88
		AU-B- 586831	27-07-89
EP-A-154884	18-09-85	AU-B- 4733485	27-03-86

		US-A- 4748111	31-05-88
		AU-B- 578933	10-11-88
EP-A-155224	18-09-85	AU-B- 3943485	19-09-85
		JP-A- 60226900	12-11-85

EP-A-155224	18-09-85	JP-A- 60218071	31-10-85



1

2

3

4

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/58 C12Q1/68 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 193, Nr. 2, März 1991 NEW YORK US, Seiten 272-279, R. BREDEHORST ET AL. 'Novel trifunctional carrier molecule for the fluorescent labeling of haptens.'	1-6, 11, 12, 16
Y	siehe das ganze Dokument ---	7-38
X	EP, A, 0 135 071 (HENNING BERLIN GMBH CHEMIE UND PHARMAWERK) 27. März 1985	1-6, 11, 12, 16, 17
Y	siehe das ganze Dokument ---	7-38
Y	EP, A, 0 507 587 (SYNTEX (U.S.A.) INC.) 7. Oktober 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	7-38
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- * 'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- * 'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- * 'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- * 'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- * 'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* 'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* 'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* 'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* 'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. November 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

23. 11. 95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Griffith, G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP,A,0 178 450 (F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AG.) 23.April 1986 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	7-38
Y	EP,A,0 154 884 (MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC.) 18.September 1985 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	7-38
A	EP,A,0 155 224 (CHROMAGENICS, INC.) 18.September 1985 siehe das ganze Dokument -----	1-38

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/02915

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-135071	27-03-85	EP-A, B 0134307 JP-A- 60070359 JP-C- 1831702 JP-A- 60173469 US-A- 4645646 US-A- 4657873	20-03-85 22-04-85 29-03-94 06-09-85 24-02-87 14-04-87
EP-A-507587	07-10-92	JP-A- 5126829	21-05-93
EP-A-178450	23-04-86	CA-A- 1261744 JP-B- 6090201 JP-A- 61073066 US-A- 5075447 US-A- 4745076 AU-B- 586831 AU-B- 4733485	26-09-89 14-11-94 15-04-86 24-12-91 17-05-88 27-07-89 27-03-86
EP-A-154884	18-09-85	US-A- 4748111 AU-B- 578933 AU-B- 3943485 JP-A- 60226900	31-05-88 10-11-88 19-09-85 12-11-85
EP-A-155224	18-09-85	JP-A- 60218071	31-10-85

